

一种防治糖尿病的天然化合物 及其制备方法与药物用途

发明领域

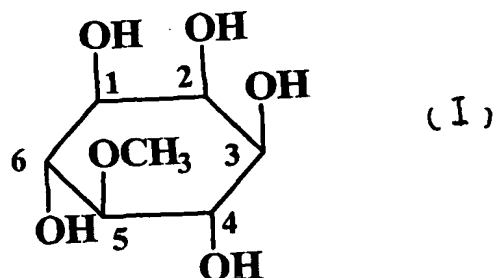
本发明涉及一种从红豆杉(*Taxus spp*), 尤其是云南红豆杉 *Taxus yunnanensis* Cheng et L. K. Fu、美丽红豆杉 *Taxus chinensis* var. *mairei* (Lemee et Levl) Cheng et L. K. Fu 等中提取、分离的具显著抗糖尿病活性的天然化合物 5-*O*-甲基-*myo*-肌醇, 简称西曲依醇(Sequoyitol), 其制备方法及其药物用途。

背景技术

随着世界人口的老齡化进程加快, 糖尿病已经成为一种常见病、多发病。目前, 糖尿病的发病机理仍不十分清楚, 它的治疗主要是用药物降低高血糖和防治并发症。胰岛素和主要口服降血糖化学合成药的发明和应用给糖尿病患者带来希望, 但它们本身仍分别存在低血糖反应、乳酸中毒等严重药物副作用, 影响了它们的使用和疗效(王中孝, 山西医科大学学报, 2000 31(6):555-556)。寻找和开发高效、低毒、安全可靠的新型降血糖物质是人类亟待解决的课题。

我国中医药学文献记载, 红豆杉(*Taxus*)叶具利尿通经作用, 可用于治疗糖尿病(全国中草药汇编 下册(第二版)主编 谢宗万, 人民卫生出版社, 722), 红豆杉治糖尿病殊效(甘伟松, 药用植物学, 1991, 140), 但红豆杉的抗糖尿病的成分及其活性的现代研究未见报道。我们对红豆杉的抗糖尿病的活性成分进行了深入的研究, 终于成功发现红豆杉中活性显著, 毒性极低的抗糖尿病的活性成分天然化合物 5-*O*-甲基-*myo*-肌醇, 简称西曲依醇(Sequoyitol), 它是

具有下面结构式 I 的化合物:



西曲依醇 (5-*O*-Methyl-*myo*-Inositol) 的母核为 *myo*-肌醇 (*myo*-Inositol), 是环己醇多种立体异构体中的一种 (环己醇具多个手性中心, 因此有多个立体异构体)。有论文称, 西曲依醇存在于红豆杉科、松科、柏科、三尖杉科和杉科等科的一些植物中 (Phytochemistry, 1971, 11:245-250)。西曲依醇的五乙酰衍生物, 由高分辨氢谱进行了结构鉴定 (Phytochemistry, 27(1):279-281, 1988)。中国药典 (1970 版, 160) 记载, *myo*-肌醇具维生素样作用。但西曲依醇 (即 5-*O*-甲基-*myo*-肌醇) 的抗糖尿病活性未见报道。

发明内容

我们的研究发现西曲依醇能显著降低糖尿病模型高血糖、抑制肝糖原分解和葡萄糖的吸收、降低血脂、改善自由基代谢和保护胰岛 β 细胞; 不降低正常小鼠血糖; 而且其毒性极低。因此, 西曲依醇可用于糖尿病及其并发症的防治, 还可用于与糖代谢紊乱有关的疾病 (如高血脂、脂肪肝和肥胖症等) 的防治, 以及用于改善自由基代谢等。

本发明还提供了一种从药用植物红豆杉中提取西曲依醇的方法, 所述方法包括: 用有机溶剂提取, 得浸膏, 将浸膏经两相萃取, 柱层析, 截留含有西曲依醇的级分, 浓缩、过滤、干燥, 再用重结晶等方法纯化, 得到含有西曲依醇的粉末。其中提取所用的有机溶剂是乙

醇、甲醇、丙酮和它们的含水物等,两相萃取所用的溶剂是水不相溶性有机溶剂,例如乙酸乙酯、氯仿、二氯甲烷、乙醚。纯化可单独或结合使用各种层析和重结晶等方法进行,重结晶使用的溶剂系统可以是含有乙醇、丙酮、甲乙酮的溶剂系统。层析可用大孔树脂(D101型、MN-200型等)柱层析、葡聚糖或改性葡聚糖(Sephadex G或Sephadex-LH-20等)柱层析、纤维素柱层析、活性炭柱层析等。最终产物为晶状粉末,主要有效成分为西曲依醇,含量可达90%以上。

本发明还提供了一种含有上述西曲依醇以及一种或多种辅助剂和/或赋型剂的药物组合物。所述药物组合物可以被制备成针剂、胶囊剂、片剂、颗粒剂、糖衣丸剂、溶液剂等药物剂型。

本发明进一步提供了上述西曲依醇用于制备治疗糖尿病的药物用途。所述药物能显著降糖尿病高血糖、抑制肝糖原分解和葡萄糖的吸收、降低血脂以及改善自由基代谢和保护胰岛 β 细胞,而且其毒性极低。所述药物可用于预防和治疗糖尿病及其糖尿病性心脑血管方面并发症,其它与糖代谢紊乱有关的疾病,改善自由基代谢,预防和治疗II型糖尿病以及糖尿病性心脑血管并发症。

更具体的说,本发明所述从药用植物红豆杉中提取防治抗糖尿病的西曲依醇的方法包括:将红豆杉的根,茎或叶等部位粉碎成粗粉;用例如乙醇、甲醇、丙酮或它们的含水物等溶剂在0℃至回流的温度下,优选室温至回流的温度下,更优选在回流的温度下提取,所用溶剂的量优选为1:1至20(重量/体积),优选1:2至10(重量/体积),更优选1:3至6(重量/体积),优选提取1-5次;经减压浓缩得浸膏,将浸膏用水不相溶性有机溶剂(例如乙酸乙酯、氯仿、二氯甲烷、乙醚)/水两相萃取,除去亲脂性有机层,所述萃取剂优选为1:0.5至10(体积/体积)的有机溶剂/水;合并水层,滤过,用柱层析分离,所述层析例如为大孔树脂柱层析(例如D101型,MN-200型(PUROLITE))

等)、葡聚糖 G 或改性葡聚糖柱层析(例如 Sephadex-LH-20 等)、纤维素柱层析以及活性炭柱层析,用相应的洗脱剂洗脱,同时监测洗脱液;收集含有西曲依醇的流份,减压浓缩、静置、过滤得固形物,用例如含有乙醇、甲醇、丙酮、甲乙酮的溶剂系统重结晶,干燥得西曲依醇粉末。最终产物为晶状粉末,西曲依醇含量达 90% 以上。

本发明所述方法中对柱层析洗脱液的监测可以用以下高效液相(HPLC)色谱条件: C18 柱, $5\mu\text{m}$, $4.6 \times 250\text{mm}$; 检测波长 220nm; 进样 $20\mu\text{l}$; 流动相, 甲醇-水(50:50), 使用前经 $0.45\mu\text{m}$ 有机滤膜抽滤并脱气, 流速 1.0ml/min 。

本发明所述产物中西曲依醇的含量可以用下述 HPLC 方法检测:

含量测定 取本品约 25mg, 精密称定, 置 25ml 量瓶中, 加稀硫酸-醋酐液(1: 50) 0.65ml, 置水浴加热 20min, 冷却至室温, 加甲醇 15ml, 摇匀, 加水至刻度, 摇匀, 得供试品溶液。HPLC 色谱条件同上。

本发明所述西曲依醇可与常规辅助剂和/或赋型剂混合, 制备成各种剂型, 用于预防或治疗糖尿病, 尤其用于治疗 II 型糖尿病。针剂、胶囊剂、片剂、颗粒剂、糖衣丸剂、溶液剂等都为可供选择的药物剂型。

胶囊剂、片剂、颗粒剂、糖衣丸剂等剂型可以含有一种或多种常用赋型剂-填料和增容剂: 如淀粉, 微晶纤维等; 粘合剂: 如羧甲基纤维素, 聚乙烯吡咯烷酮等; 致湿剂: 如甘油; 崩解剂: 如碳酸钙等; 吸收剂: 如高岭土等; 润滑剂: 如滑石粉等。

药用赋型剂可以是固体、半固体、液体等各种形态的, 配方辅助剂可以是各种类型的。

溶液剂可以含有一般的溶剂、增溶剂、乳化剂、防腐剂等, 如水、乙醇、甘油、聚乙二醇、苯甲酸苄酯等。

胶囊剂、片剂、颗粒剂、糖衣丸剂、溶液剂等剂型可以用已知的常规方法制备，可以将西曲依醇与一种或多种赋型剂混合，制备剂型。

对于非肠道给药的剂型，溶液或乳剂度应是无菌和等渗的。

附图说明

本发明附图 1 是按照下述方法制备的 Ac-西曲依醇的 X-单晶衍射图。

优选实施方案

以下将在实施例中对本发明进行更加详细的说明，但应理解的是，以下实施例仅为说明之目的，而不限制本发明的范围。

实施例

实施例 1: 天然活性化合物西曲依醇的制备 1

红豆杉粗粉 60kg，以 4 倍体积 90% 乙醇回流提取三次，合并提取液浓缩成稠状溶液；用旋转蒸发仪减压浓缩至干，用 1:1 (体积/体积) 的氯仿/H₂O 两相萃取，合并水层，滤过，上大孔树脂柱 (D101 型，国产)，以蒸馏水、含水乙醇 (乙醇:5% - 20%) 梯度洗脱，各洗脱液分别用 HPLC 鉴别，合并含有西曲依醇的洗脱液，于旋转蒸发仪中减压浓缩至干，乙醇重结晶，过滤得晶状粉末，抽干，用 95% 乙醇重结晶 2 次，抽滤，于 70℃ 下干燥，得西曲依醇结晶，得率 0.07%。

实施例 2: 天然活性化合物西曲依醇的制备 2

红豆杉粗粉 70kg，以 3 倍体积 80% 甲醇于 50℃ 提取三次，合并提取液，浓缩成浆状溶液；用旋转蒸发仪减压浓缩至干，用 1:2

(体积/体积)的乙酸乙酯/H₂O 两相萃取, 合并水层, 滤过, 上大孔树脂柱(MN-200型), 以蒸馏水、含水乙醇(乙醇:5%-20%)梯度洗脱, 各洗脱液分别用HPLC鉴别, 合并含有西曲依醇的洗脱液, 于旋转蒸发仪中减压浓缩至干, 丙酮重结晶, 过滤得晶状粉末, 抽干, 用丙酮:乙醇(1:1)重结晶2次, 抽滤, 于70℃下干燥, 得西曲依醇结晶, 得率0.08%。

实施例 3: 天然活性化合物西曲依醇的制备 3

红豆杉粗粉 65kg, 以 4 倍体积 75% 丙酮于 45℃ 提取三次, 合并提取液浓缩成稠状溶液; 用旋转蒸发仪减压浓缩至干, 用 2:1(体积/体积)的二氯甲烷/H₂O 两相萃取, 合并水层, 滤过, 上活性碳(药用规格)柱, 以蒸馏水、含水乙醇(乙醇:5%-30%)梯度洗脱, 各洗脱液分别用鉴别, 合并含有西曲依醇的洗脱液, 于旋转蒸发仪中减压浓缩至干, 甲醇重结晶, 过滤得晶状粉末, 抽干, 用甲醇重结晶2次, 抽滤, 于70℃下干燥, 得西曲依醇结晶, 得率0.07%。

实施例 4: 西曲依醇胶囊剂的制备

处方: 每粒 0.2g, 含 25mg 西曲依醇。

微晶纤维	175g
西曲依醇	25g
1000 粒	

将辅料放置于研磨容器中, 加入西曲依醇, 研磨混合 10-30 分, 至均匀。将混匀的药粉, 灌装于 1 号胶囊中, 随机抽样, 每粒装量控制在 0.2g。

实施例 5: 西曲依醇片剂的制备

西曲依醇 25g, 微晶纤维素 49g, 硬脂酸镁 1g, 充分混合; 混合物用单冲压片机压成直径 6mm, 重 300mg 的片剂, 每片含 100mg 的西曲依醇。

实施例 6: 颗粒剂制备

西曲依醇 20g, 加玉米淀粉 180g, 充分混合, 加适量乙醇 (60%) 制成软材, 过 12 目筛造颗粒, 经干燥后得颗粒剂, 每 1g 颗粒剂含 100mg 的西曲依醇。

实施例 1 中制得的天然化合物的化学结构鉴定如下:

1、天然化合物的化学结构鉴定:

熔点用双目镜视显微熔点测定仪 (未校正) 测定; 红外用 Perkin-Elementer 983 型红外光谱仪测定 (KBr 压片); 电喷雾电离质谱用 finnigan 公司 LCQ 型质谱仪测定; 旋光用 PE-241MC 型旋光仪测定; 核磁共振谱用 Bruker ACF-300 (^1H -NMR 300MHz) TMS 或 DSS 为内标。

实施例 1 中制得的产物, 其理化和波谱数据如下: 无色结晶, $\text{MP} 232 \sim 234^\circ\text{C}$, $\text{IR}_{\text{KBr}} (\text{cm}^{-1})$: 3427, 3356, 3188 (OH), 1032 (C-O-C). $\text{ESI}(+) \text{MS} (m/z)$: 217.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; ^1H -NMR ($\text{D}_2\text{O}+\text{DSS}$, 300MHz, ppm): 3.53 (2H, dd, $J=2.9, 10.0$, H-1+H-3); 4.04 (1H, dd, $J=2.9, 2.9$, H-2); 3.67 (1H, dd, $J=9.8, 9.7$, H-4+H-6), 3.05 (1H, dd, $J=9.4, 9.4$, H-5); 3.59 (3H, s, O- CH_3). ^{13}C -NMR ($\text{D}_2\text{O}+\text{DSS}$, 75MHz, ppm): 86.79 (CH, C-5), 74.57 (CH, C-2), 74.31 (CH $\times 2$, C-4 和 C-6), 73.69 (CH $\times 2$, C-1 和 C-3), 62.27 (O CH_3). 分析表明其结构为 5-O-甲基-*myo*-肌醇, 即西曲依醇。

2、西曲依醇的五乙酰化合物 (Ac-西曲依醇) 的制备:

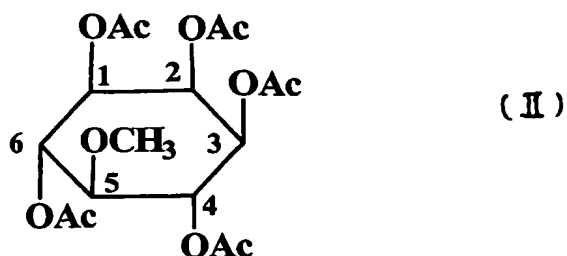
为进一步证实西曲依醇的结构,用 Ac_2O 在酸性条件下进行全乙酰化反应,制备西曲依醇的五乙酰化合物 (Ac-西曲依醇),进行结构鉴定:

反应试剂的制备: AR 浓硫酸 1.0ml, 加蒸馏水至 4ml, 取 0.25ml 加入 12.5ml Ac_2O 中, 混匀备用。

西曲依醇的五乙酰化合物 (Ac-西曲依醇) 的制备: 取实施例 1 的产物 200mg, 溶于 5.0ml 上述反应试剂中, 在水浴中于 87°C 左右反应 20 分钟, 冷至室温, 在冰浴中, 搅拌下慢慢加入 100 ml 蒸馏水, 然后再在水浴中于 87°C 左右加热 20 分钟, 冷至室温, 转至分液漏斗中, 加 CH_2Cl_2 进行两相萃取 (共 3 次), 合并 CH_2Cl_2 液, 在旋转蒸发仪中减压蒸干, 得无色晶状固体, 用乙醚/无水乙醇重结晶, 得无色透明块状晶体 (即 Ac-西曲依醇)。

3、西曲依醇的五乙酰化合物 (Ac-西曲依醇) 的结构鉴定:

化合物 Ac-西曲依醇为无色块状结晶, $\text{MP} 201 \sim 202^\circ\text{C}$; $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$, $\text{ESI}(+)\text{MS}(\text{m/z}): 427.1[\text{M}+\text{Na}]^+$; $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 300\text{MHz}, \text{ppm}): 5.54(1\text{H}, \text{t}, \text{J}=2.8, \text{H}-2); 5.45(2\text{H}, \text{t}, \text{J}=10.05, \text{H}-4 \text{ and } \text{H}-6); 5.01(2\text{H}, \text{dd}, \text{J}=2.8, 10.5, \text{H}-1 \text{ and } \text{H}-3); 3.42(1\text{H}, \text{t}, \text{J}=9.7, \text{H}-5), 3.45(3\text{H}, \text{s}, \text{OCH}_3); 2.16(3\text{H}, \text{s}, \text{C}_2-\text{OAc}); 2.08(6\text{H}, \text{s}, \text{OAc} \times 2); 1.99(6\text{H}, \text{s}, \text{OAc} \times 2)$ 。 $^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3, 75\text{MHz}, \text{ppm}): 169.85(1\text{C}, \text{C}_2-\text{OCOCH}_3), 169.63(2\text{C}, \text{OCOCH}_3 \times 2), 169.41(2\text{C}, \text{OCOCH}_3 \times 2), 80.08(1\text{C}, \text{C}-5), 70.60(2\text{C}, \text{C}-4+\text{C}-6), 68.78(2\text{C}, \text{C}-1+\text{C}-3), 68.36(1\text{C}, \text{C}-2), 60.02(1\text{C}, \text{OCH}_3), 20.39, 20.67(\text{共 } 5\text{C}, \text{OCOCH}_3 \times 5)$ 。我们还测定了 Ac-西曲依醇的 $^1\text{H}-^1\text{H} \text{ COSY}^1\text{H}-^{13}\text{C} \text{ COSY}$ 、 $^1\text{H}-^{13}\text{C} \text{ COLOG}$ 远程相关谱, 归属了该化合物的氢谱和碳谱。与西曲依醇相比, Ac-西曲依醇的分子量增加 210 (相当于 5 个乙酰基的质量), 数据表明 Ac-西曲依醇是西曲依醇的五乙酰化产物), 结构式如下:



4、Ac-西曲依醇的 X- 单晶衍射

为了确证 Ac-西曲依醇的结构，对其结晶进行 X- 单晶衍射测定。Ac-西曲依醇的 X- 单晶衍射测定结果确证了 Ac-西曲依醇的结构(见说明书附图 1)，由此，化合物西曲依醇的结构和相对构型得到证实。

用实施例 1 中制得的天然化合物（西曲依醇），进行以下药效学实验和毒理学和一般药理学研究：

一、 主要药效学实验

实验材料

动物：昆明种小鼠，体重 20-24 g

SD 大鼠，体重 230-290 g，雄性

药物及试剂：

西曲依醇（发明人制备）

降糖灵（Phenformine, 阳性对照）（江苏省金坛市制药厂）

四氧嘧啶（美国 Sigma 公司）

葡萄糖测定试剂盒（上海荣盛生物技术有限公司）

优降糖（Glibenclamide, 阳性对照）（天津太平洋制药有限公司）

盐酸肾上腺素注射液（武汉制药集团股份有限公司）

肝糖原测定试剂盒（南京建成生物工程研究所）

50%葡萄糖注射液（江苏常州国营武进制药厂）
胆固醇测定试剂（上海荣盛生物技术有限公司）
丙二醛测定试剂盒（南京建成生物工程研究所）
蛋白测定试剂盒（南京建成生物工程研究所）
甘油三酯测定试剂盒（上海荣盛生物技术有限公司）
超氧化物歧化酶测定试剂盒（南京建成生物工程研究所）
胰岛素测定试剂盒（河南省焦作市解放免疫诊断试剂研究所）
链脲霉素（美国 sigma 公司 Lot 119 H1029）

一、西曲依醇对四氧嘧啶诱发的小鼠血糖升高的时效试验

1. 实验方法^[1, 2]

取小鼠 30 只，尾静脉注射四氧嘧啶 65 mg/kg，按文献方法造模，根据血糖值分为 3 组，其中 2 组分别按 0.1 ml/10g 体重经口给予西曲依醇 50 mg/kg 和降糖灵 75 mg/kg，模型组给予等体积的蒸馏水，连续 7 天，末次给药前禁食 2 小时，给药后 1 小时、2 小时、3 小时、5 小时，以葡萄糖氧化酶法测定血糖。

2. 结果

与对照组相比，50 mg/kg 西曲依醇在给药后 1 小时有降低四氧嘧啶诱发的高血糖趋势（降低 100.0mg/dl）、给药后 2 小时显著降低四氧嘧啶诱发的高血糖（降低 140.7mg/dl）、给药后 3 小时（降低 193.9mg/dl）和 5 小时（降低 174.6mg/dl）极显著降低四氧嘧啶诱发的高血糖。降糖灵在给药后 1 小时（降低 163.1mg/dl）和 2 小时（降低 159.3mg/dl）极显著降低四氧嘧啶诱发的高血糖、给药后 3 小时（降低 104.2mg/dl）显著降低四氧嘧啶诱发的高血糖、而 5 小时（降低 56.6mg/dl）后仅有降低四氧嘧啶诱发的高血糖趋势。50 mg/kg 西曲依醇 的降糖作用强于降糖灵 75 mg/kg。

二、西曲依醇对四氧嘧啶诱发的小鼠血糖升高的影响

1. 实验方法^[1, 2]

小鼠 60 只, 随机取出 10 只为正常组, 其余小鼠尾静脉注射四氧嘧啶 65 mg/kg, 按文献方法造模, 根据血糖值分为 5 组, 其中 4 组分别按 0.1 ml/10g 体重经口给予 25、50、100 mg/kg 西曲依醇和降糖灵 75 mg/kg, 正常组及模型组给予等体积的蒸馏水, 连续 7 天。以葡萄糖氧化酶法测定血糖。胰腺浸泡在 10%福尔马林中, 石蜡包埋切片, HE 染色。

2. 结果

与正常组相比, 对照组小鼠血糖极显著升高(升高 308.2mg/dl)。与对照组相比, 西曲依醇的小剂量组(降低 95.6mg/dl)有降低高血糖的趋势, 而中、大剂量组和降糖灵组极显著地降低四氧嘧啶诱发的高血糖, 西曲依醇的降糖作用呈剂量依赖性, 100 mg/kg 西曲依醇(降低 306.8mg/dl)和 50 mg/kg 西曲依醇组(降低 195.2mg/dl)的作用强于降糖灵 75 mg/kg 组(降低 152.8mg/dl)。胰腺病理组织检查显示, 正常组胰岛呈团索状, 境界清楚, 胰岛细胞呈多边形, 胞浆丰富, 核圆居中。胰岛数及岛内细胞数均较多, 间质小血管无明显改变, 未见明显炎细胞浸润。对照组胰岛数量明显减少, 胰岛体积缩小, 胰岛内细胞数减少, 细胞体积缩小, 岛内间质小血管显著玻璃样变, 和炎细胞浸润。与模型组相比, 西曲依醇各剂量组的胰岛数量和胰岛内细胞数量均明显增加, 而降糖灵组胰岛数目和胰岛细胞数目略微增加。病理组织学检查结果证实了西曲依醇的作用优于降糖灵。

三、西曲依醇对正常小鼠血糖的影响

1. 实验方法^[3]

取小鼠 50 只, 随机分为 5 组, 其中 4 组分别按 0.1 ml/10g 体

重经口给予西曲依醇 25、50、100 mg/kg 和优降糖 50 mg/kg, 正常组给予等体积的蒸馏水, 连续 7 天。以葡萄糖氧化酶法测定血糖。

2. 结果

西曲依醇各剂量组 (25、50、100mg/kg) 与正常组 (139.0 ± 17.8 mg/dl) 血糖无明显差异, 而优降糖组 (50mg/kg) 显著地降低正常组的血糖 (降低 19.3 mg/dl)。

四、西曲依醇对肾上腺素诱发的小鼠血糖升高的影响

1. 实验方法^[3]

取小鼠 72 只, 随机分为 6 组, 其中 4 组分别按 0.1 ml/10g 体重经口给予 25、50、100 mg/kg 西曲依醇和优降糖 10 mg/kg, 正常组及模型组给予等体积的蒸馏水, 连续 7 天。除正常组注射等体积的生理盐水外, 其余各组腹腔注射肾上腺素 0.2 mg/kg, 注射后 30 分钟, 以葡萄糖氧化酶法测定血糖。同时取肝脏, 以蒽酮法测定肝糖原。

2. 结果

与正常组相比, 对照组小鼠血糖极显著升高。与对照组相比, 西曲依醇各剂量组 ((降低 32.2, 35.5, 39.9 mg/dl) 和优降糖组 ((降低 40.1mg/dl) 显著降低肾上腺素诱发的高血糖。同时, 对照组小鼠肝糖原极显著降低。与对照组相比, 西曲依醇小 (升高 1.76mg/g 肝组织), 大剂量组 (升高 1.24mg/g 肝组织) 极显著升高低下的肝糖原含量, 西曲依醇中剂量组 (升高 1.02mg/g 肝组织) 和优降糖组升高 1.28mg/g 肝组织) 显著升高低下的肝糖原含量。

五、西曲依醇对葡萄糖诱发的小鼠血糖升高的影响

1. 实验方法^[4]

取小鼠 72 只, 随机分为 6 组, 其中 4 组分别按 0.1 ml/10g 体重经口给予 25、50、100 mg/kg 西曲依醇和降糖灵 75 mg/kg, 正常

组及对照组给予等体积的蒸馏水，连续 7 天。除正常组外，其余各组腹腔注射葡萄糖 2 g/kg，正常组注射等体积的生理盐水，注射后 30、60、90、120 分钟，小鼠眼眶后静脉丛取血，分离血清，以葡萄糖氧化酶法测定血糖。

2. 结果

与正常组相比，对照组小鼠腹腔注射葡萄糖后 30、60、90、120 分钟，血糖极显著升高。与对照组相比，西曲依醇小，中剂量组在腹腔注射葡萄糖后 30、60、90 分钟，显著降低葡萄糖诱发的高血糖；西曲依醇大剂量组和降糖灵组在腹腔注射葡萄糖后 30、60、90、120 分钟，极显著降低葡萄糖诱发的高血糖；西曲依醇的作用基本呈剂量依赖性，100 mg/kg 西曲依醇的降糖作用(90 分钟，降低 24.5mg/dl)与降糖灵 75 mg/kg(90 分钟，降低 20.5mg/dl)相当。

六、西曲依醇对四氧嘧啶诱发的大鼠血糖升高的影响

1. 实验方法^[5,6]

随机取出大鼠 5 只为正常组，其余 55 只大鼠禁食 14-16 小时后，腹腔注射戊巴比妥钠 30 mg/kg，麻醉后股静脉注射四氧嘧啶 48 mg/kg，按文献方法造模，根据血糖值分为 5 组，每组 11 只，其中 4 组分别按 1 ml/100g 体重经口给予西曲依醇 25、50、100 mg/kg 和降糖灵 75 mg/kg，正常组及模型组给予等体积的蒸馏水，连续 18 天，分别于给药后第 6、12 天以葡萄糖氧化酶法测空腹血糖。第 18 天时，股动脉取血，并测定血清中血糖，胰岛素水平、胆固醇含量、甘油三酯含量、丙二醛含量、超氧化物歧化酶活力；肝组织匀浆，测肝组织中丙二醛的含量和超氧化物歧化酶活力；胰腺浸泡在 10%福尔马林中，石蜡包埋切片，HE 染色。

2. 结果

与正常组相比，对照组大鼠空腹血糖极显著升高。与对照组相比，

西曲依醇小剂量组在给药后第 12 天时有降低四氧嘧啶诱发的高血糖的趋势, 在第 18 天时极显著降低四氧嘧啶诱发的高血糖(降低 194.4mg/dl)。西曲依醇中剂量组(6 天, 12 天和 18 天分别降低 129.1, 200.7, 223.1mg/dl), 大剂量组(6 天, 12 天和 18 天分别降低 120, 218.2, 240.3mg/dl)和降糖灵组在给药后第 6 天起极显著降低四氧嘧啶诱发的高血糖, 西曲依醇的降糖作用基本呈剂量依赖性。

与正常组相比, 对照组大鼠血清胰岛素水平显著降低。与对照组相比, 西曲依醇小剂量组(回升 $1.01 \mu \text{IU/ml}$), 中剂量组(回升 $1.45 \mu \text{IU/ml}$)和降糖灵组有使低下的胰岛素水平回升的趋势, 西曲依醇大剂量组明显使低下的血清胰岛素水平回升(回升 $3.36 \mu \text{IU/ml}$)。西曲依醇的作用基本呈剂量依赖性。

与正常组相比, 对照组大鼠血清甘油三酯和胆固醇含量极显著升高。与对照组相比, 西曲依醇各剂量组显著或极显著降低血清甘油三酯和胆固醇含量(50mg/kg 组, 血清甘油三酯和胆固醇含量分别降低 15.7, 22.2mg/dl), 而降糖灵组对血清胆固醇和甘油三酯含量无明显影响。

与正常组相比, 对照组大鼠血清丙二醛含量显著升高, 同时肝组织丙二醛含量有升高的趋势。与对照组相比, 西曲依醇各剂量组极显著降低血清丙二醛含量(100mg/kg 组, 降低 4.13nmol/ml), 另外, 西曲依醇大剂量组还明显降低肝组织的丙二醛含量(降低 4.29nmol/mgprot), 西曲依醇的作用基本呈剂量依赖性。而降糖灵组仅有降低血清和肝组织丙二醛含量的趋势。

与正常组相比, 对照组大鼠血清和肝组织超氧化物歧化酶活力显著降低。西曲依醇各剂量组能使低下的血清超氧化物歧化酶活力回升(100mg/kg 组, 回升 55.0NU/ml), 西曲依醇中, 大剂量组也能使低下的肝组织超氧化物歧化酶活力回升(100mg/kg 组, 回升

18.3NU/mgprot), 而降糖灵组对血清和肝组织超氧化物歧化酶活力无明显影响。

与正常组相比, 对照组大鼠的体重明显减轻, 与对照组相比, 小剂量组在第 15 天时有增加糖尿病大鼠体重的趋势, 在第 17 天时明显增加糖尿病大鼠的体重。中、大剂量组在第 13 天时有增加糖尿病大鼠体重的趋势, 从第 15 天起明显增加糖尿病大鼠的体重。而降糖灵组的体重变化不大明显。

胰腺组织学检查结果: 正常组胰岛呈团索状, 境界清楚, 胰岛细胞呈多边形, 胞浆丰富, 核圆居中。胰岛数及岛内细胞数均较多, 间质小血管无明显改变, 未见明显炎细胞浸润。对照组胰岛数量明显减少, 胰岛体积缩小, 胰岛内细胞数减少, 细胞体积缩小, 间质小血管显著玻璃样变, 和明显的炎细胞浸润。与模型组相比, 西曲依醇各剂量组和降糖灵组的胰岛数量和胰岛内细胞数量均明显增加, 西曲依醇的中、大剂量组间质血管玻璃样变程度较轻及浸润的炎细胞减少, 而且西曲依醇的改善间质血管玻璃样变的作用优于降糖灵。

七、西曲依醇对链脲霉素诱发的小鼠血糖升高的影响

1. 实验方法^[7,8]

小鼠 66 只, 随机取出 10 只为正常组, 其余小鼠尾静脉注射链脲霉素 160 mg/kg, 按文献方法造模, 根据血糖值分为 5 组, 其中 4 组分别按 0.1 ml/10g 体重经口给予 25、50、100 mg/kg 西曲依醇和降糖灵 75 mg/kg, 正常组及模型组给予等体积的蒸馏水, 连续 18 天, 分别于给药后第 6、12 天时, 以葡萄糖氧化酶法测定血糖。第 18 天时, 摘眼球取血, 分离血清, 并测定血清中血糖, 胰岛素水平、胆固醇含量、甘油三酯含量、丙二醛含量、超氧化物歧化酶活力; 肝组织匀浆, 测肝组织中丙二醛的含量和超氧化物歧化酶的活力;

胰腺浸泡在 10%福尔马林中，石蜡包埋切片，HE 染色。

2. 结果

与正常组相比，对照组小鼠血糖极显著升高。与对照组相比，西曲依醇各剂量组和降糖灵组在给药后第 12 天起显著降低链脲霉素诱发的高血糖(50mg/kg 组，降低 121.4mg/dl)。

与正常组相比，对照组小鼠血清胰岛素水平极显著降低。与对照组相比，西曲依醇小剂量组和降糖灵组有使低下的胰岛素水平回升的趋势，西曲依醇中、大剂量组明显使低下的血清胰岛素水平回升(100mg/kg 组，回升 6.53 μ IU/ml)。

与正常组相比，对照组小鼠血清甘油三酯和胆固醇含量显著升高。与对照组相比，西曲依醇小、中剂量组显著降低血清甘油三酯含量，并有抑制血清胆固醇升高的趋势；西曲依醇大剂量组极显著地降低血清甘油三酯和显著地降低胆固醇含量；西曲依醇的作用基本呈剂量依赖性；而降糖灵组对血清甘油三酯和胆固醇的含量无明显影响。

与正常组相比，对照组小鼠肝组织丙二醛含量显著升高。与对照组相比，西曲依醇小、中剂量组显著降低肝组织的丙二醛含量，大剂量组极显著降低肝组织的丙二醛含量，而降糖灵组对肝组织丙二醛含量无明显影响。

与正常组相比，对照组小鼠血清超氧化物歧化酶活力明显低下。西曲依醇各剂量组极显著升高低下的血清超氧化物歧化酶活力，而降糖灵组对血清超氧化物歧化酶活力无明显影响。

与正常组相比，对照组小鼠的体重明显减轻，与对照组相比，小剂量组从第 11 天起有增加糖尿病小鼠体重的趋势。中、大剂量组从第 7 天起明显增加糖尿病小鼠的体重。而降糖灵组的体重变化不大明显。

胰腺组织学检查结果：正常组胰岛呈团索状，境界清楚，胰岛细胞呈多边形，胞浆丰富，核圆居中。胰岛数及岛内细胞数均较多，间质小血管无明显改变，未见明显炎细胞浸润。对照组胰岛数量明显减少，胰岛体积缩小，胰岛内细胞数减少，细胞体积缩小，间质小血管显著玻璃样变，和明显的炎细胞浸润。与模型组相比，西曲依醇各剂量组的胰岛数量和胰岛内细胞数量均明显增加并抑制炎细胞浸润，而且，西曲依醇的大剂量组间质血管玻璃样变程度较轻，降糖灵仅略微增加胰岛数量和胰岛内细胞数量，也不改善间质血管玻璃样变。病理组织学的检查证实了 50 mg/kg 及 100 mg/kg 西曲依醇的作用优于降糖灵 75 mg/kg。

药效学实验小结：

西曲依醇对正常小鼠血糖，四氧嘧啶糖尿病小鼠和大鼠血糖、肾上腺素模型小鼠血糖、葡萄糖性高血糖小鼠血糖、链脲霉素糖尿病小鼠血糖的药效研究表明：西曲依醇对正常小鼠血糖无明显影响，但是能显著降低肾上腺素诱发的高血糖，并使低下的肝糖原回升，对葡萄糖引起的血糖升高有显著的耐糖作用。机体维持一定的血糖水平，是通过血中的葡萄糖的吸收，利用与转化、贮存之间的动态平衡来实现的，控制血糖的生成与代谢，除胰岛素等调适机体碳水化合物的代谢以维持血糖外，肝糖原的分解与合成，也是调节血糖含量的一个重要因素。肾上腺素不直接破坏胰岛 β 细胞，不影响胰岛素的分泌，但通过兴奋 α , β 受体，促进肝糖原的分解而引起血糖升高。西曲依醇对正常小鼠血糖无明显影响，提示其可能对正常糖代谢过程无明显影响，但能明显抑制肝糖原分解和葡萄糖的吸收。

四氧嘧啶和链脲霉素能选择性地破坏胰岛 β 细胞，使机体胰岛

素分泌不足引起类似人的糖尿病表现，动物出现多尿、多饮，消瘦及血糖显著升高。四氧嘧啶大鼠和链脲霉素小鼠模型中，血糖、血清甘油三酯、胆固醇、丙二醛显著升高，血清胰岛素和超氧化物歧化酶活力显著降低。西曲依醇能降低升高的血糖，血清甘油三酯、胆固醇、丙二醛含量，回升胰岛素水平和超氧化物歧化酶的活力（降糖灵无此作用）。近年来的研究证明自由基代谢参与了糖尿病的发生和发展过程，糖尿病状态时机体自由基产生增多，组织脂质过氧化程度严重，加重组织损伤及并发症的发生。西曲依醇改善了自由基代谢，减少了组织和血液中自由基对脂蛋白的不饱和脂肪酸残基的攻击，减轻了脂质过氧化程度，因而减低了自由基在糖尿病的发生和发展过程中所起的破坏作用。而且西曲依醇降低血清中胆固醇和甘油三酯含量，提示其对糖尿病性心脑血管方面并发症有一定的防治作用，也有助于防止糖尿病患者脂肪肝的形成。但西曲依醇对正常小鼠血糖无明显影响，却能使低下的胰岛素水平回升，病理研究结果表明西曲依醇能改善四氧嘧啶或链脲霉素所致的胰岛损伤。提示西曲依醇不是刺激胰岛 β 细胞释放胰岛素，而可能对胰岛 β 细胞有保护作用，促进损伤的胰岛 β 细胞功能恢复或再生。

以上结果表明，西曲依醇不降低正常小鼠血糖，但能抑制肝糖原分解和葡萄糖的吸收，并能治疗四氧嘧啶和链脲霉素实验性糖尿病模型，保护胰岛 β 细胞，降低血脂以及改善自由基代谢。西曲依醇药效十分显著，特色突出，优势明显，可用于治疗糖尿病。

药效学实验方法参考文献

1. 武玉鹏等 胰康降血糖作用 中医药研究 1997, 13(1): 57-59.
2. 徐淑云等 主编 药理实验方法学 第二版 人民卫生出版社 1994: 1275-1278.

3. 张冰等 菊苣胶囊对小鼠血糖水平的影响 北京中医药大学学报 1999, 22 (1): 28-30.
4. 陈卫辉等 麦冬多糖对正常和实验性糖尿病小鼠血糖的影响 中国现代应用药学杂志 1998, 15 (4): 21-23.
5. 李向中等 益津降糖口服液的降糖降血脂作用 沈阳药科大学学报 2000, 17 (5): 371-374.
6. 王树荣等 消渴降糖颗粒对糖尿病大鼠降糖抗自由基效应的观察 中药药理与临床 2000, 16 (增刊): 109-111.
7. 杨晓峰等 消渴安降糖、降脂作用的研究 中药新药与临床药理 1999 10 (5): 288-289.
8. 张均田主编 现代药理实验方法上册 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社 1998 年第一版 981-983.

二、毒理学研究

一) 口服给药急性毒性试验

1. 实验方法

取正常小鼠 20 只, 雌雄各半, 每组 10 只, 分别按 18.95 g/kg, 9.47 g/kg 一次灌服, 其中高剂量已达最大浓度和最大给药体积, 观察动物的反应, 7 天后处死, 肉眼观察各脏器。

2. 实验结果

动物无一死亡, 健康情况良好、皮毛光泽、眼红明亮、活动度好。7 天后处死小鼠, 肉眼观察主要脏器均无异常。因其毒性极低或无毒, 无法测出小鼠口服西曲依醇的 LD_{50} 。

二) 口服给药最大耐受试验

1. 实验方法

取正常小鼠 20 只空腹, 雌雄各半, 经口给予 西曲依醇, 24 小

时内给药两次, 间隔 8 小时, 一日内为 37.9 g/kg。观察动物的反应, 14 天后处死, 肉眼观察主要脏器。

2. 实验结果

动物无一死亡, 健康情况良好、皮毛光泽、眼红明亮、活动度好。14 天后处死动物, 肉眼观察各脏器均无异常。

三) 静脉给药急性毒性试验

1. 实验方法

取正常小鼠 20 只空腹, 雌雄各半, 静脉注射 5.04g/kg 西曲依醇 (已达最大浓解度和最大静脉给药体积), 观察动物的反应, 14 天后处死, 肉眼观察各脏器。

2. 实验结果

动物健康情况良好、皮毛光泽、眼红明亮、活动度好。14 天后处死小鼠, 肉眼观察主要脏器均无异常。因其毒性极低或无毒, 无法测出小鼠静脉给于西曲依醇的 LD₅₀。

毒理学研究实验方法参考文献

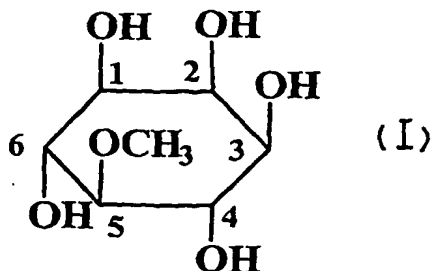
1. 药新药研究指南 (药、药理学、毒理学) 中华人民共和国卫生部药政局
2. 陈奇 主编 中药药理研究方法学 人民卫生出版社 1993 年第 1 版 118-119

三、一般药理学研究

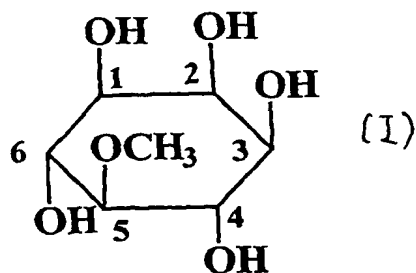
观察了西曲依醇对正常小鼠一般体征和自发活动的影响、对小鼠戊巴比妥钠睡眠时间的影响、对正常大鼠呼吸运动、血压、心率及心电图的影响。研究表明: 西曲依醇对小鼠自发活动、小鼠戊巴比妥钠睡眠时间及大鼠呼吸运动、血压、心率、心电图均无明显影响。

权 利 要 求

1. 一种从红豆杉 (*Taxus species*) 中提取的具抗糖尿病作用的天然单体化合物, 其特征在于它是具有下面结构式 I 的 5-*O*-甲基-*myo*-肌醇:



2. 一种从红豆杉 (*Taxus spp*) 中提取防治糖尿病的天然化合物的方法, 所述方法包括: 用溶剂提取, 得浸膏, 将浸膏经两相萃取, 柱层析, 收集含有 *myo*-肌醇衍生物类化合物的流份, 浓缩、析晶、过滤、得到粉末, 经重结晶进一步纯化, 得到具有下面结构式 I 的天然单体化合物 5-*O*-甲基-*myo*-肌醇:



3. 根据权利要求 2 的方法, 其特征在于所述红豆杉是云南红豆杉 (*Taxus yunnanensis* Cheng et L. K. Fu)、南方红豆杉 (*Taxus chinensis* var. *mairei* (Lemee et Levl) Cheng et L. K. Fu)。
4. 根据权利要求 2 的方法, 其特征在于提取所用的有机溶剂是乙醇、甲醇、丙酮和它们的含水物等。
5. 根据权利要求 2 的方法, 其特征在于两相萃取所用的溶剂是水

不相溶性有机溶剂。

6. 根据权利要求5的方法,其特征在于所用的有机溶剂是乙酸乙酯、氯仿、二氯甲烷、乙醚。

7. 根据权利要求2的方法,其特征在于所述层析为大孔树脂柱层析、葡聚糖G或改性葡聚糖柱层析、纤维素柱层析或活性炭柱层析。

8. 根据权利要求2的方法,其特征在于重结晶使用的溶剂系统可以是含有乙醇、甲醇、丙酮、甲乙酮、或它们的混合物的溶剂系统。

9. 一种治疗糖尿病的药物组合物,其特征在于含有权利要求1所述的天然单体化合物,与一种或多种辅助剂和/或赋型剂混合。

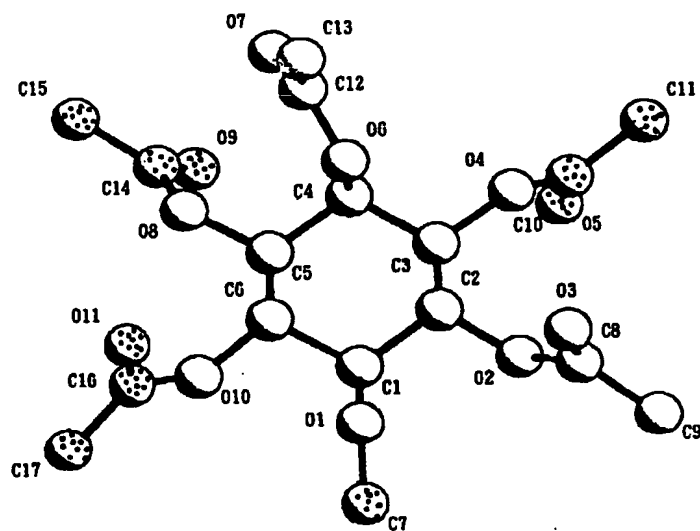
10. 根据权利要求9的药物组合物,其特征在于其可以被制备成针剂、胶囊剂、片剂、颗粒剂、糖衣丸剂、溶液剂等药物剂型。

11. 根据权利要求1的天然单体化合物用于制备治疗和预防糖尿病的药物用途。

12. 根据权利要求11的用途,其特征在于所述药物能显著降糖尿病高血糖、抑制肝糖原分解和葡萄糖的吸收、降低血脂以及改善自由基代谢和保护胰岛 β 细胞,而且其毒性极低。

13. 根据权利要求11的用途,其特征在于所述药物可用于预防和/或治疗糖尿病及其糖尿病性心脑血管方面并发症,其它与糖代谢紊乱有关的疾病,以及改善自由基代谢。

14. 根据权利要求11的用途,其特征在于所述药物可用于预防和/或治疗II型糖尿病以及糖尿病性心脑血管并发症。



Ac-西曲依醇的 X-单晶衍射结构图

Fig. 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN02/00728

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ C07C43/196 C07C41/34 A61P3/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07C A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, PAJ, CNPAT, STN, CROSS-FIRE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Murakami et al, "Chemical and Chemotaxonomical Studies on Filices. LVI", Yakugaku Zasshi, 1995, 105(7), 649-654, (see the whole document)	1-8
X	Nasim Sultana et al, "Two novel prenylated flavones from the aerial parts of Melicope micrococca", Phytochemistry, 1999, 50, 1249-1253, (see the whole document)	1-8
X	P. Dittrich et al, "D-1-O-methyl-mucoinositol In Higher Plants", Phytochemistry, 1971, 11, 245-250, (see the whole document, In particular the table)	1
X	Laurens Snderson et al, "Inositol Methyl Ethers, II, The Formula of Sequoyitol", J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 1171-1174, (see the first paragraph)	1

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
25.02.2004

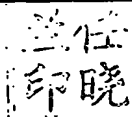
Date of mailing of the international search report

11 · MAR 2004 (11 · 03 · 2004)

Name and mailing address of the ISA/CN
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, .
100088 Beijing, China
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer
Ren Xiaolan

Telephone No. 86-10-62085598



国际检索报告

国际申请号
PCT/CN02/00728

A. 主题的分类

IPC' C07C43/196 C07C41/34 A61P3/10

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

C07C A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

WPI, EPODOC, PAJ, CNPAT, STN, CROSS-FIRE

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
X	Murakami et al, "Chemical and Chemotaxonomical Studies on Filices. LVI", Yakugaku Zasshi, 1995, 105(7), 649-654, (see the whole document)	1-8
X	Nasim Sultana et al, "Two novel prenylated flavones from the aerial parts of Melicope micrococca", Phytochemistry, 1999, 50, 1249-1253, (see the whole document)	1-8
X	P. Dittrich et al, "D-1-O-methyl-mucoinositol In Higher Plants", Phytochemistry, 1971, 11, 245-250, (see the whole document, In particular the table)	1
X	Laurens Snderson et al, "Inositol Methyl Ethers, II, The Formula of Sequoyitol", J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 1171-1174, (see the first paragraph)	1

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☐ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

"A" 明确叙述了被认为不是特别相关的一般现有技术的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先的申请或专利

"L" 可能引起对优先权要求的怀疑的文件, 为确定另一篇
引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引
用的文件

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相
抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理"X" 特别相关的文件, 仅仅考虑该文件, 权利要求所记载的
发明就不能认为是新颖的或不能认为是有创造性"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件
结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时,
权利要求记载的发明不具有创造性

"&" 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

25.02 月.2004

国际检索报告邮寄日期

11 · 3月 2004 (11 · 03 · 2004)

国际检索单位名称和邮寄地址

ISA/CN

中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号: 86-10-62019451

受权官员

任晓兰

电话号码: 86-10-62085598